基础医学·论著

缺氧通过驱动M1巨噬细胞极化诱发睾丸间质细胞溶酶体依赖性死亡导致生精功能受损

孟 丹[1],何 畏[1],曾继涛[1,2] 陆军军医大学(第三军医大学):[1]第一附属医院生殖医学中心,[2]基础医学院免疫学教研室,重庆

[摘要] **目的** 探究缺氧通过驱动M1型巨噬细胞极化,进而诱发睾丸间质细胞溶酶体依赖性细胞死亡(lysosome-dependent cell death,LDCD)在生精功能障碍中的关键作用。**方法** 将10只8周龄雄性SD大鼠(体质量220~250 g)按照完全随机设计,分为常氧组(n=5)与缺氧组(n=5),分别置于常氧饲养环境和模拟5 000 m海拔的低压低氧环境暴露4周以构建缺氧动物模型。采用1%O_2低氧工作站处理TM3(小鼠睾丸间质细胞)2 d以构建缺氧细胞模型,并建立RAW 264.7巨噬细胞与TM3细胞的Transwell共培养体系。采用睾丸组织HE染色进行病理形态学分析并计算生精细胞数量/生精小管面积;通过ELISA方法(以BCA法标化)检测睾丸组织睾酮含量;利用免疫荧光染色定量睾丸组织间质细胞(CYP11A1$^+$)数量和M1型巨噬细胞(CD68$^+$/CD86$^+$)与细胞玻片中M1型巨噬细胞(iNOS$^+$)极化;应用公共数据库(PRJNA926018)的单细胞转录组测序(scRNA-seq)数据与基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis,GSEA)筛选间质细胞中的程序性死亡方式;借助LysoTracker探针与组织蛋白酶B(cathepsin B,CTSB)免疫荧光染色评估TM3细胞溶酶体完整性及通透性。**结果** 在体实验发现缺氧状态显著降低大鼠睾丸生精小管中生精细胞数量(P<0.01)及睾酮含量(P<0.01),伴随间质细胞(CYP11A1$^+$)数量减少(P<0.01)。scRNA-seq揭示缺氧条件下长形精子细胞、间质细胞、支持细胞比例显著减少(P<0.01),然而精母细胞和精原细胞比例显著上调(P<0.01),并且间质细胞中LDCD通路显著富集(P=0.002 7)。除此之外,缺氧环境可诱导M1型巨噬细胞浸润(CD68$^+$/CD86$^+$)睾丸,并且缺氧也能促进RAW 264.7细胞中iNOS$^+$表达(P<0.01)。体外Transwell共培养实验提示单独缺氧不影响TM3细胞溶酶体膜稳定性,而与缺氧处理的RAW 264.7细胞共培养加剧溶酶体通透性。**结论** 缺氧可能是通过驱动M1型巨噬细胞极化,进而诱发睾丸间质细胞溶酶体依赖性细胞死亡,最终导致睾酮合成减少与生精功能障碍。

[关键词] 缺氧;睾丸;间质细胞;巨噬细胞;溶酶体

[中图法分类号] R329.26;R339.21;R364.4 [文献标志码] A

Hypoxia drives spermatogenic impairment by triggering lysosome-dependent death of Leydig cells *via* M1 macrophage polarization

MENG Dan[1], HE Wei[1], ZENG Jitao[1,2] [1]Reproductive Medical Center, First Affiliated Hospital, [2]Institute of Immunology, College of Basic Medical Science, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

[**Abstract**] Objective To investigate the critical role of hypoxia in impairing spermatogenesis *via* M1 macrophage polarization and subsequent induction of lysosome-dependent cell death (LDCD) in Leydig cells. Methods Ten eight-week-old male SD rats (weight 220~250 g) were randomly divided into normoxia (n=5)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82401862)

[通信作者] 曾继涛,E-mail:jitaozeng@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:孟丹,何畏,曾继涛. 缺氧通过驱动M1巨噬细胞极化诱发睾丸间质细胞溶酶体依赖性死亡导致生精功能受损[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(23):2893-2902. DOI:10.16016/j.2097-0927.202510077.

Citation:MENG D,HE W,ZENG J T. Hypoxia drives spermatogenic impairment by triggering lysosome-dependent death of Leydig cells *via* M1 macrophage polarization[J]. J Army Med Univ,2025,47(23):2893-2902. DOI:10.16016/j.2097-0927.202510077.

and hypoxia groups (n=5). Hypoxic models were established by housing rats in hypoxic chambers simulating 5 000 m altitude for 4 weeks. TM3 mouse Leydig cells underwent 1% O_2 exposure for 2 d. A transwell co-culture system integrated RAW 264.7 macrophages and TM3 cells. Testicular histopathology was evaluated *via* HE staining (spermatogenic cells/tubular area). Testosterone levels were quantified by ELISA (BCA-quantified). Immunofluorescence assessed Leydig cells ($CYP11A1^+$), M1 macrophages ($CD68^+/CD86^+$ in tissue; $iNOS^+$ in cells), and lysosomal integrity (LysoTracker/CTSB staining). Single-cell RNA-seq data (PRJNA926018) with GSEA identified programmed cell death pathways. **Results** Hypoxia significantly reduced spermatogenic cell density (P<0.01), testosterone levels (P<0.01), and Leydig cell counts (P<0.01). scRNA-seq revealed decreased proportions of elongated spermatids, Leydig cells, and sertoli cells (P<0.01), but increased spermatocytes/spermatogonia (P<0.01), with significant LDCD enrichment in Leydig cells (P=0.002 7). Hypoxia induced testicular M1 macrophage infiltration ($CD68^+/CD86^+$) and elevated $iNOS^+$ in RAW 264.7 cells (P<0.01). Transwell co-culture showed hypoxia-treated macrophages, but not hypoxia alone, disrupted lysosomal membrane stability in TM3 cells. **Conclusion** Hypoxia impairs spermatogenesis by driving M1 macrophage polarization, triggering LDCD in Leydig cells, and reducing testosterone synthesis.

[**Key words**] hypoxia; testis; Leydig cells; macrophages; lysosome

Supported by the Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82401862). Corresponding author: ZENG Jitao, E-mail: jitaozeng@tmmu.edu.cn

男性不育目前是全球男性中常见的健康问题,影响6%~8%的男性人口[1]。从1990年至2017年,全球男性不育症的患病率每年增长0.291%[2]。导致男性不育的因素包括肥胖、心理压力和环境污染物等,此外,多种情况均可导致睾丸缺氧,包括高海拔暴露、睡眠呼吸暂停、睾丸扭转和精索静脉曲张等,这些环境缺氧和病理性缺氧因素均被报道导致男性生育功能受损,因此缺氧是导致男性不育的原因之一[3-5]。哺乳动物细胞对氧浓度的变化极为敏感,当缺氧时,大多数细胞会迅速增加参与氧稳态的特定基因的转录,以应对低氧条件[6]。缺氧对生殖系统的损伤不同于常见的心肺脑等损伤,其具有隐匿性,短期表现为无明显症状,但后期可引起不育等生殖难题,所以阐明其机制并开发早期干预策略成为该领域亟待解决的难点。

精子的产生取决于睾丸生精小管中高度动态的细胞分化过程,称为精子发生。睾酮对于精原细胞数量维持、血液睾丸屏障完整性、减数分裂的完成以及精子细胞的黏附和精子形成至关重要[1]。睾酮主要由睾丸中间质细胞产生,但是当前针对缺氧对睾丸睾酮产生的研究出现两种矛盾,一些研究发现急性缺氧会导致血清睾酮增加,而其他研究发现,随着缺氧时间延长血清睾酮水平显著下降[1]。这种争议提示,长期缺氧下睾酮稳态失衡可能存在尚未被揭示的调控节点。

本课题组前期研究揭示了附睾间质中以成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等为代表的缺氧敏感细胞群,通过KLF4-ASH1L-ICAM-1轴促进NK细胞激活致缺氧大鼠附睾损伤[7],表明免疫微环境的改变可能是多种病因所致男性生育力下降的关键因素,然而,慢性缺氧对睾丸局部免疫微环境的确切影响及其机制尚不完全清楚。

本研究通过整合体内、外缺氧模型,scRNA-seq及细胞共培养技术,系统性探索缺氧对睾丸生精功能的影响,揭示了"缺氧-M1型巨噬细胞-间质细胞溶酶体依赖性细胞死亡(lysosome-dependent cell death, LDCD)生精功能障碍"这一调控机制。本研究旨在为理解缺氧性男性不育的病理过程提供新的实验基础,也为其防治提供潜在的干预靶点。

1 材料和方法

1.1 *实验动物*

10只8周龄健康雄性SD大鼠(体质量220~250 g)购自陆军军医大学实验动物管理中心,实验动物的护理和使用程序已获得陆军军医大学实验动物福利与伦理委员会的批准(AMUWEC20224177)。实验前,所有大鼠在标准条件下适应性饲养1周后,按照完全随机设计分为常氧组(n=5)和缺氧组(n=5)。缺氧组置于陆军军医大学高原军事医学系低氧舱(模拟海拔5 000 m的低气压低氧环境),持续4周,每周更换垫料和饮用水。常氧组在常氧条件下饲养4周。整个过程中,所有大鼠单笼饲养(无其他动物),自由获取相同的饲料和水,每天12 h光照/黑暗循环,温度设定为18 ℃。低氧暴露4周结束后,所有大鼠通过异氟烷吸入进行深度麻醉,在确认痛觉反射消失后执行安乐

死,并立即解剖获取睾丸组织样本。一侧固定于4%多聚甲醛用于形态学分析,另一侧迅速冻存于-80 ℃用于后续分子生物学检测。

本实验预期的不良事件主要为缺氧可能引起的动物体质量减轻、活动减少及精神萎靡。其标准包括:体质量下降超过初始体质量的20%;出现呼吸、摄食或饮水困难;出现攻击行为。在饲养期间,每周观察大鼠状态,预期的不良事件在本次实验过程中没有出现。

1.2 实验试剂

小鼠巨噬细胞系RAW 264.7细胞、小鼠睾丸间质细胞系TM3细胞及TM3细胞专用培养基均购自中国Procell公司;苏木精溶液、伊红染料、EDTA抗原修复缓冲液(pH=8.0)及PBS缓冲液(pH=7.4)购自中国武汉赛维尔生物有限公司;睾酮ELISA检测试剂盒购自中国武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;BCA蛋白检测试剂盒购自中国北京新赛美生物科技有限公司;3% BSA、LysoTracker及Hoechst 33342染色液购自中国上海碧云天生物技术有限公司;抗CYP11A1抗体、抗CD68抗体、抗CD86抗体及抗组织蛋白酶(cathepsin B,CTSB)抗体购自中国武汉爱博泰克生物科技有限公司;抗荧光猝灭封片剂(含DAPI)购自中国上海艾方生物科技有限公司;TSA四色试剂盒购自中国上海爱必信生物科技有限公司。

1.3 细胞培养

RAW 264.7细胞和TM3细胞分别置于37 ℃,20% O_2,5% CO_2培养箱中制备常氧细胞模型,置于参数设置为37 ℃、1%O_2,5%CO_2和94%N_2低氧工作站(invivo2-400)制备缺氧细胞模型,每3天进行换液。

1.4 HE染色及生精小管中生精细胞数量分析

固定睾丸组织后,经脱水、透明、浸蜡包埋,制备组织切片。在染色前,将切片用二甲苯和梯度酒精中处理,依次使用苏木精溶液和伊红染料染色。通过PreciPoint M8对整个切片进行扫描后进行组织形态学分析,使用Fiji软件中的插件对完整横截面生精小管面积进行测量,计数其中生精细胞数量,生精细胞计数涵盖了从精原细胞到长形精子细胞的所有发育阶段。计数主要依据细胞核的独特形态学特征进行区分,排除了具有不规则三角形细胞核和明显核仁的支持细胞。以生精细胞数量/生精小管面积作为分析参数,2组各5只大鼠,每只大鼠睾丸选择同等视野下3个生精小管进行分析,取其平均值,通过R语言进行箱线图绘制。

1.5 睾丸睾酮含量检测

取出冻存于-80 ℃睾丸组织,根据睾丸组织质量加入PBS(100 μL/mg),组织匀浆,以室温、5 000 r/min离心10 min,吸取上清液,通过睾酮ELISA试剂盒检测睾酮浓度,再通过BCA检测试剂盒检测上清液总蛋白浓度,睾酮含量用组织匀浆上清液睾酮浓度/蛋白浓度(pg/mg)表示。

1.6 Transwell实验

将TM3细胞按照$2\times10^5/cm^2$的密度接种于预先放置细胞玻片的24孔Transwell孔板下室,另在Transwell上室加入2倍于TM3细胞的RAW 264.7细胞,常规培养6 h,待两种细胞贴壁后,将Transwell上层RAW 264.7细胞转入TM3细胞孔中,分别进行常氧和缺氧培养。

1.7 免疫荧光染色法

睾丸石蜡组织切片按照“1.4”所述方法进行预处理。使用EDTA抗原修复缓冲液(pH=8.0)进行抗原修复,进行2轮加热处理。载玻片用PBS(pH=7.4)冲洗3次,并用3%BSA进行封闭,以阻断非特异性结合,处理时间为30 min。用稀释后的第一抗体CYP11A1(1∶100)进行孵育,4 ℃过夜。随后将样本进行洗涤,并在室温避光条件下与荧光标记二抗一起孵育60 min,PBS(pH=7.4)洗3次,并在室温下用抗荧光猝灭封片剂(含DAPI)进行封片。

1.8 双重荧光免疫组织化学染色

按照说明书使用TSA四色试剂盒对睾丸组织切片依次进行染色。所使用的抗体和荧光染料如下:抗CD68(1∶100)/TSA 520,抗CD86(1∶100)/TSA 570。切片用TBST洗涤2次,并用抗荧光猝灭封片剂(含DAPI)封片。使用LSM 710倒置共聚焦显微镜进行免疫荧光成像。

1.9 细胞玻片免疫荧光染色

4%多聚甲醛固定细胞玻片,并用Triton X-100进行通透处理。按照前述免疫荧光实验的步骤,将玻片与抗CTSB抗体(1∶100)一起孵育。

1.10 单细胞转录组分析

单细胞转录组数据来自PRJNA926018,本研究分别为常氧组和低氧组的scRNA-seq数据构建了Seurat对象。每个实验使用相同的过滤条件和归一化方法。具体而言,仅保留UMI数量>1 000、基因数量>500、Log_{10}GenesPerUMI>0.8以及线粒体比例<0.2的细胞。Harmony R包被用于进行聚类分析,以将细胞归一化为总UMI读数计数,并消除样本之间的潜在变异。整合数据使用前3 000个高度变异性基因和

1~40个主成分进行了主成分分析。用于UMAP的降维处理。在Seurat包中使用了FindConservedMarkers函数来确定在每种细胞群体中的标志物。根据文献中报道的标志物对细胞群体进行注释,并使用Seurat包中的DotPlot函数绘制气泡图。

1.11 基因集富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)

18种程序性细胞死亡基因集来自已发表文献[8],分别构建这些基因集的gmt文件,利用ClusterProfiler包中GSEA函数对常氧组和缺氧组中间质细胞簇差异基因进行分析,图像中展示被富集到的细胞死亡方式基因集。

1.12 细胞玻片LysoTracker/Hoechst染色

在单独缺氧培养和Transwell共培养的TM3细胞玻片的培养孔中进行实验,弃去培养基,使用无血清培养基稀释LysoTracker至100 nmol/L。分别置于37 ℃、5%CO_2培养箱和低氧工作站中孵育40 min,弃去LysoTracker工作液,使用37 ℃预热的PBS洗涤3次。加入500 μL Hoechst 33342染色液避光孵育15 min,弃去Hoechst工作液后,PBS洗涤3次显微镜下拍照。

1.13 统计学分析

本研究中的计量资料(睾酮含量、生精细胞与间质细胞数量、荧光强度)均以$\bar{x}\pm s$表示,并使用R语言进行统计分析。根据数据正态性检验结果,选用参数检验(独立样本t检验)或非参数检验(Mann-Whitney U检验)进行组间两两比较。统计图表通过ggplot2包绘制,P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧导致睾丸生精功能损伤

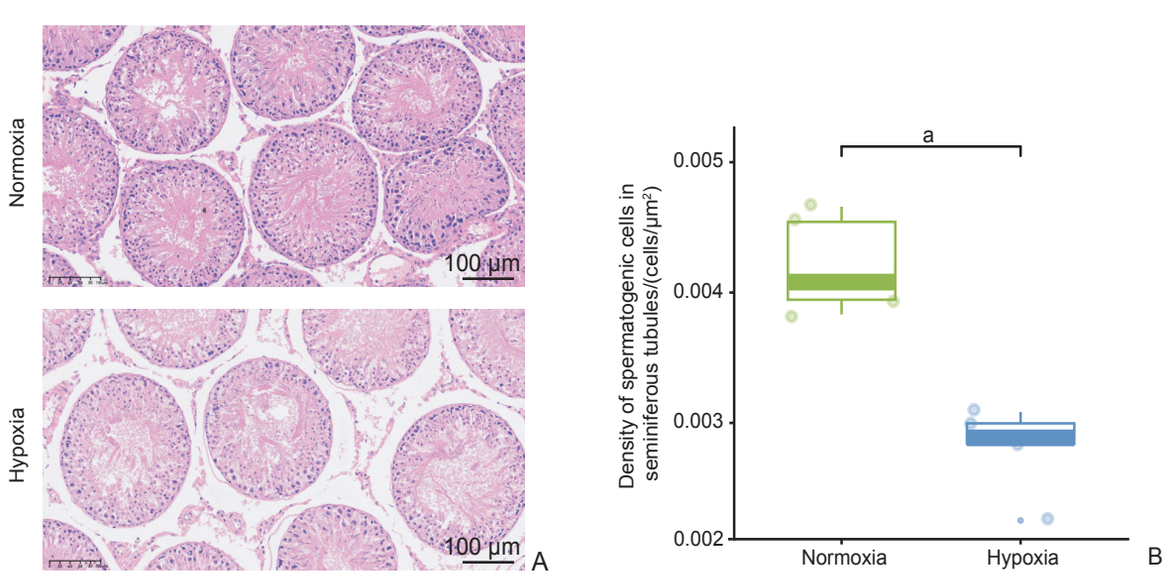
为了解缺氧对睾丸组织病理的影响,本研究通过睾丸石蜡组织切片HE染色对显微镜图像进行组织形态学分析,并计数生精小管中生精细胞数量,计算对应管腔面积。分析结果显示,常氧组生精小管结构完整,生精上皮排列紧密,可见5~8层清晰的生精细胞,而缺氧组生精细胞排列松散、紊乱,生精小管生精上皮仅剩2~4层细胞(图1A)。此外,发现缺氧组大鼠生精上皮表现出生精细胞数量显著减少(以管腔面积标化)的病理学改变(P<0.01,图1B)。提示缺氧环境可导致睾丸生精功能受损。

2.2 缺氧导致睾丸中睾酮含量显著减少

为进一步明确生精细胞减少是否和睾丸中睾酮含量变化有关,本研究通过ELISA检测(以BCA标化)睾丸组织睾酮含量,发现缺氧组大鼠睾丸中睾酮含量显著低于常氧组(P<0.01,图2)。提示缺氧导致的生精功能受损可能与睾酮减少有关。

2.3 缺氧导致睾丸中间质细胞显著减少

为明确睾酮含量减少是否伴随睾丸间质细胞的数量变化,本研究通过使用CYPP1A1抗体标记睾丸间

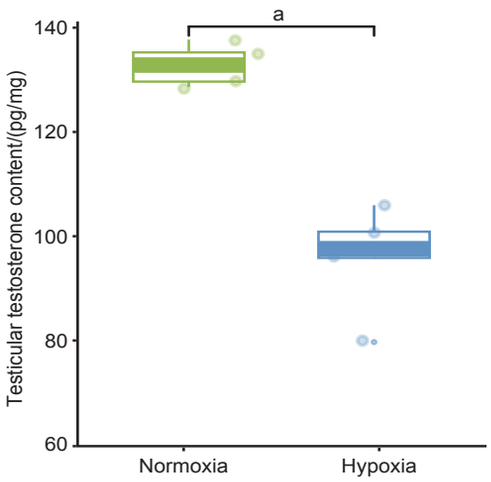


a: P<0.01

A: Hematoxylin and Eosin staining of rat testicular tissue under normoxic and hypoxic conditions; B: Box plot of spermatogenic cell count (per tubule lumen area)

图1 常氧和缺氧大鼠睾丸组织HE染色图(n=5)

Figure 1 HE staining of rat testicular tissue under normoxic and hypoxic conditions(n=5)



a: P<0.01

图2 常氧和缺氧大鼠睾丸睾酮含量(n=5)

Figure 2 Testosterone levels in rat testes under normoxic and hypoxic conditions(n=5)

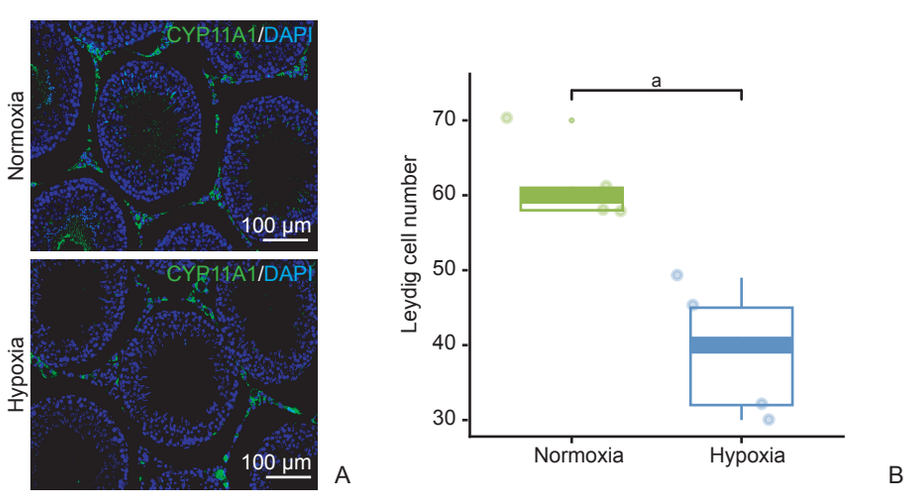
质细胞,对大鼠睾丸组织切片进行免疫荧光染色,计算管腔周围的间质细胞数量,发现缺氧组大鼠睾丸石蜡组织切片中间质细胞数量显著减少(P<0.01,图3)。提示缺氧能够导致睾丸间质细胞数量减少,从而导致睾酮含量降低。

2.4 单细胞RNA测序(scRNA-seq)绘制常氧和缺氧组大鼠睾丸细胞图谱

为进一步探索间质细胞减少的机制,本研究通过下载数据库中常氧和缺氧处理大鼠睾丸的单细胞数据(PRJNA926018),按照本研究方法部分进行质量控制,降维聚类及细胞簇注释,发现睾丸中主要存在8类主要细胞,包括高表达*Tssk3*、*Odf1*和*Tppp2*的长形精子细胞(Enlongating ST);高表达*Cst12*和*Aard*的支持细胞(Sertoli Cells);高表达*Iqcf6*、*Pex5l*和*Fam71b*的圆型精子细胞(Round ST);高表达*Spag6*、*Piwil1*和*Tbpl1*的精母细胞(Spermatocytes);高表达*Syce2*、*Crabp1*和*Sycp1*的精原细胞(Spermatogonia);高表达*S100a6*、*Col1a1*、*Col3a1*和*Vim*的成纤维细胞(Fibroblast);高表达*Lyz2*、*RT1-Da*、*Tyrobp*、*RT1-Ba*和*Fcer1g*的巨噬细胞(Macrophage);高表达*Cyp11a1*、*Ces1d*、*Insl3*、*Tmem176a*和*Cyp17a1*的间质细胞(Leydig cells),见图4A、B。通过比较各样本中每个细胞簇的比例发现缺氧组中长形精子细胞、成纤维细胞、间质细胞、支持细胞比例显著减少(P<0.01),然而精母细胞和精原细胞比例显著上调(P<0.01,图4C、D)。这些结果表明缺氧能够显著改变睾丸中细胞组成。

2.5 缺氧导致睾丸中间质细胞LDCD显著上调

为明确间质细胞减少的原因,本研究通过GSEA分析常氧和缺氧scRNA-seq中间质细胞簇差异基因在多种细胞死亡信号通路中的富集情况,发现缺氧组大鼠睾丸间质细胞中,LDCD信号通路被显著富集(P=0.002 7),提示缺氧导致睾丸间质细胞LDCD增多(图5A)。为此,本研究对TM3细胞进行常氧和缺氧培养2 d后进行CTSB免疫荧光染色,发现常氧和缺氧组中CTSB在主要聚集于细胞质中,并且呈现出块状染色(图5B),为了进一步明确溶酶体的完整性,本研究通

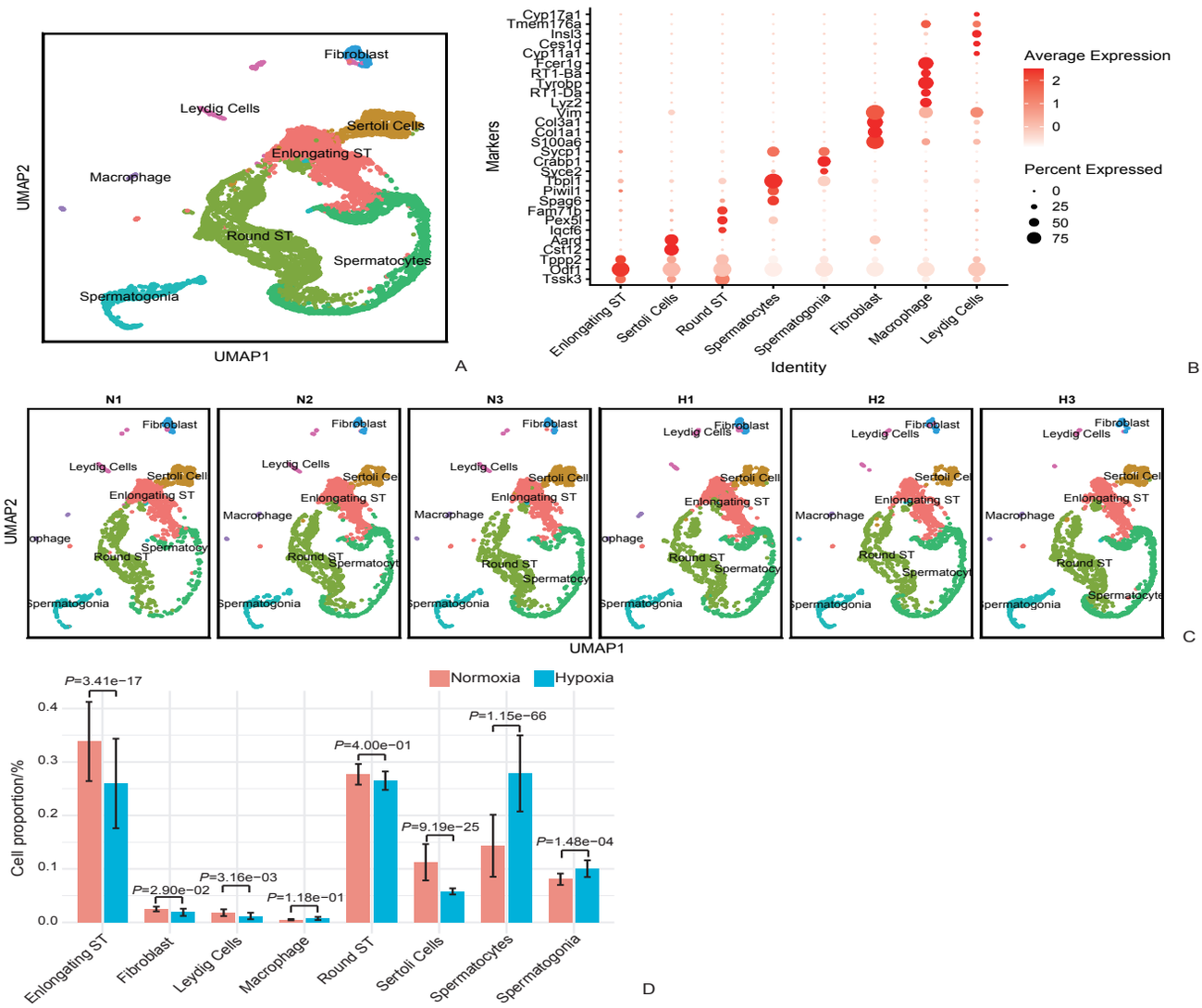


a: P<0.01

A: Representative images of CYP11A1 immunofluorescence staining; B: Box plot of Leydig cell count

图3 常氧和缺氧大鼠睾丸组织CYP11A1免疫荧光染色图(n=5)

Figure 3 CYP11A1 immunofluorescence staining in rat testicular tissue under normoxic and hypoxic conditions(n=5)



A: Dimensionality-reduced clustering UMAP plot of rat testicular single-cell transcriptomic data; B: Bubble plot displaying marker genes for each cell cluster; C: Sample-specific UMAP plots showing dimensionality-reduced clustering of single-cell transcriptomic data N1-3: normoxic group replicates 1-3; H1-3: hypoxic group replicates 1-3; D: Proportions of cell clusters in normoxic (N) and hypoxic (H)groups (n=3)

图4 常氧和缺氧大鼠睾丸组织单细胞转录组测序分析

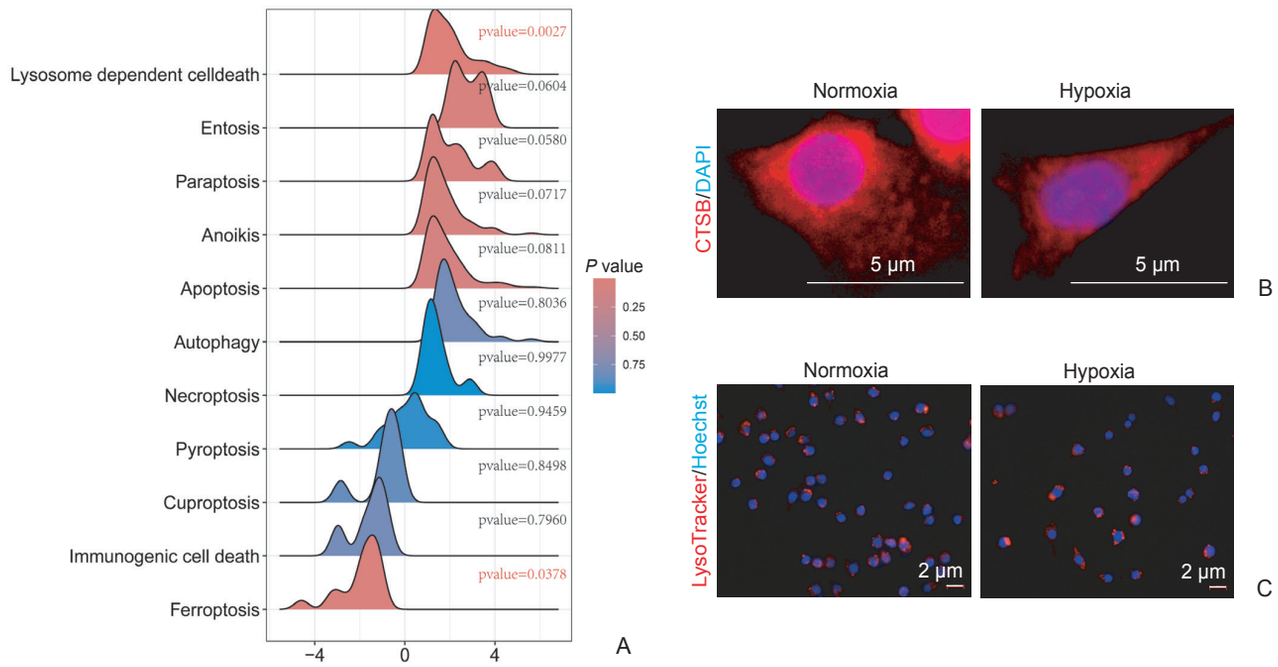
Figure 4 Single-cell RNA sequencing analysis of rat testicular tissue under normoxic and hypoxic conditions

过LysoTracker和Hoechst对TM3细胞玻片进行染色,在常氧和缺氧TM3细胞细胞质中均能观察到与CTSB染色类似的溶酶体分布(图5C),这些发现意味着单独缺氧并不能诱导TM3细胞出现溶酶体通透性增加。

2.6 缺氧通过M1型巨噬细胞促进缺氧间质细胞LDCD

为进一步探究缺氧诱导间质细胞LDCD的机制,本研究在睾丸组织切片中进行了CD86和CD68是双重免疫荧光染色观察M1型巨噬细胞,发现缺氧后睾丸中M1型巨噬细胞增多(图6A)。为了明确缺氧对巨噬细胞M1极化的影响,本研究缺氧培养RAW 264.7细胞48 h,进行M1型巨噬细胞标志物iNOS的免疫荧光染色,发现缺氧能够显著促进RAW 264.7中iNOS的表达(P<0.01,图6B、C)。提示缺氧可能促进巨噬细胞向M1型巨噬细胞极化。

为了进一步观察缺氧条件下巨噬细胞对TM3细胞LDCD的影响,本研究利用Transwell小室共培养,并制备细胞玻片进行CTSB免疫荧光染色,发现在常氧下共培养组的TM3细胞表现出CTSB块状聚集,而缺氧下共培养组的TM3细胞则表现出CTSB弥散甚至消



A: Gene Set Enrichment Analysis results for cell death pathways; B: Representative images of CTSB immunofluorescence staining in TM3 Leydig cells; C: Representative images of LysoTracker and Hoechst staining in TM3 Leydig cells

图5 缺氧对间质细胞LDCD的影响

Figure 5 Hypoxia-induced lysosome-dependent cell death in Leydig cells

失(图6D),进一步,本研究还通过LysoTracker染色发现缺氧共培养组的TM3细胞溶酶体显著减少,Hoechst染色观察到细胞核染色异常(图6E),意味着溶酶体完整性遭到破坏,细胞死亡。这些结果表明,缺氧可能通过M1型巨噬细胞促进睾丸间质细胞LDCD。

3 讨论

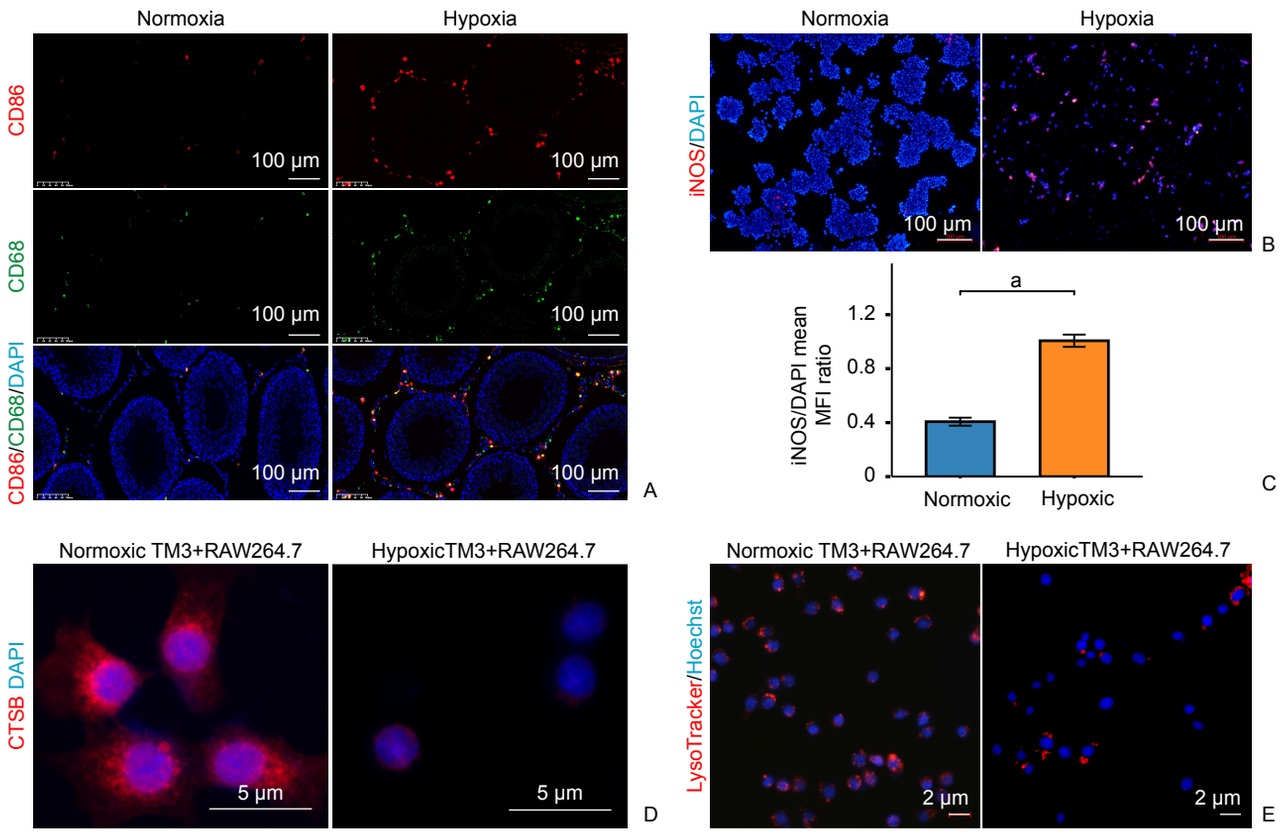
3.1 缺氧影响睾酮水平导致生精功能受损

环境和病理性缺氧已被证实与精子质量差有关,其能够导致生精小管上皮紊乱,生精细胞脱落。睾酮作为睾丸间质细胞分泌的主要类固醇激素,通过经典内分泌途径和局部旁分泌/自分泌途径调控精子发生全过程。本研究发现,长期缺氧对睾丸生精功能的负面影响:缺氧组大鼠生精小管结构紊乱,生精细胞密度显著降低;并揭示其病理学改变与睾丸局部睾酮含量显著下降及间质细胞数量减少密切相关。与短期或间歇性缺氧的睾酮表现呈现相反结果[9-10],但是与多数长期缺氧导致睾酮降低的研究一致[11-14],值得注意的是,短期或间歇性缺氧呈现相反的结论基于血浆睾酮水平,而后者需通过肝脏、肾脏、结合蛋白及肠道菌群等多重复杂机制进行清除以维持稳态。本研究通过检测睾丸组织局部睾酮而非血浆睾酮,有效避免了全身代谢清除的干扰,更准确地揭示了缺氧对睾丸睾酮生成功能的直接抑制。

已有研究报道减数分裂过程中,睾丸睾酮水平下降、抗雄激素的给药或间质细胞的减少,均会导致发育中的精子细胞从支持细胞中脱落,并在减数分裂过程中停止精子生成[15]。本研究从scRNA-seq层面提供了缺氧对睾丸细胞组成影响的新证据,发现缺氧导致长形精子细胞与支持细胞比例显著下降,而精原细胞与精母细胞比例相对上升。这一分布变化与已知的"精子发生后期阶段更依赖于高浓度睾酮"的规律高度吻合[16-18]。因此,本研究将缺氧导致的生精障碍,归因于间质细胞数量减少所引起的局部睾酮合成不足。这为理解缺氧环境下睾丸生精功能的细胞动力学基础提供了新见解。

3.2 缺氧促进巨噬细胞向M1极化

巨噬细胞作为睾丸中数量最多的免疫细胞,对维持睾丸的免疫特权状态和促进睾丸炎症和纤维化方面具有重要作用[19]。本研究发现,缺氧在体内诱导M1型巨噬细胞在睾丸间质中浸润,缺氧还能促进RAW 264.7巨噬细胞iNOS表达,证实缺氧对巨噬细胞向促炎M1表型的极化作用。缺氧是巨噬细胞极化的关键调控因素,其影响具有显著的情境依赖性。尽



a: $P<0.01$

A: Representative images of CD86/CD68 double immunofluorescence staining in rat testicular tissue sections; B: Representative images of iNOS immunofluorescence staining in TM3 Leydig cells under normoxic and hypoxic conditions; C: Bar chart showing the ratio of mean iNOS fluorescence intensity to mean DAPI fluorescence intensity; D: Representative images of CTSB immunofluorescence staining in TM3 Leydig cells following Transwell co-culture with RAW 264.7 macrophages; E: Representative images of LysoTracker and Hoechst staining in TM3 Leydig cells after Transwell co-culture with RAW 264.7 macrophages

图6 缺氧对睾丸中M1型巨噬细胞及对Transwell共培养TM3细胞LDCD的影响(n=5)

Figure 6 Hypoxia-induced M1 macrophage polarization and lysosome-dependent cell death in TM3 Leydig cells in Transwell co-culture(n=5)

管在肿瘤微环境中缺氧常关联M2型极化[20-21],但在诸如缺血再灌注等炎症性病理过程中,缺氧是巨噬细胞向M1极化的驱动因素[22-24]。类似的,在体外研究中也发现缺氧通过HIF-1α驱动巨噬细胞进入糖酵解模式,被观察到与M1表型相关[25]。然而,也有研究指出,在特定细胞系(如THP-1或BMDM)中,缺氧处理可以直接诱导M2相关基因的表达[26]。这些体内外证据表明缺氧对巨噬细胞极化呈现时相性和双向性特征。本研究在无其他炎性刺激的单纯缺氧模型中观察到M1极化,提示缺氧本身足以启动睾丸的炎性免疫应答,揭示了缺氧作为破坏该豁免状态的关键应激原。M1型巨噬细胞可能作为缺氧性睾丸损伤的早期诊断标志物和潜在干预靶点。

3.3 缺氧状态下M1型巨噬细胞可能诱导睾丸间质细胞LDCD

LDCD是一种受调节的细胞死亡形式,由溶酶体膜通透性增加引发,导致溶酶体酶的细胞质释放和随后的细胞损伤[27]。CTSB属于半胱氨酸蛋白酶家族,是一种重要的溶酶体蛋白酶,有助于回收蛋白质并维持溶酶体蛋白稳态,对维持正常溶酶体和细胞功能至关重要,其在溶酶体泄漏后会释放到细胞质中[28]。已有研究在体外细胞实验中发现缺血/缺氧显著降低LAMP2蛋白水平,加剧溶酶体膜通透性变化和心肌细胞死亡[29],还有研究发现HIF-2α通过诱导肝巨噬细胞中溶酶体应激,导致LDCD增加[30]。这些发现表明,缺氧与LDCD密切正相关,然而,缺氧大鼠睾丸中

间质细胞是否发生LDCD,以及缺氧是否直接调控该过程,目前尚不清楚。本研究通过scRNA-seq发现缺氧大鼠睾丸间质细胞LDCD通路显著富集,但体外实验表明,单纯缺氧并不足以直接诱发TM3间质细胞溶酶体膜通透性增加。这一矛盾提示,间质细胞LDCD的激活依赖于细胞间通讯。

多项研究发现M1型巨噬细胞能够通过炎症因子和外泌体等导致细胞溶酶体膜通透性变化,CTSB释放到细胞质中导致细胞死亡[31-32]。这些报道提示M1型巨噬细胞可能与睾丸间质细胞出现LDCD相关,本研究发现LDCD的激活并非缺氧直接作用于TM3细胞,而是通过巨噬细胞介导的旁分泌信号实现。意味着保护缺氧下的生精功能,策略重心可以从单纯"对抗缺氧"转向"中断免疫攻击"。

综上所述,缺氧所致的生精功能损害是一个连续过程:由M1型巨噬细胞浸润启动,进而通过增加间质细胞LDCD导致睾酮合成减少,最终引发精子发生障碍。本发现为治疗和预防生理性或病理性缺氧所致男性生育力减损提供了新的治疗思路。本研究虽然部分揭示了缺氧所致男性生育力减损的机制,但仍有诸多问题需要进一步探索,比如睾丸中M1型巨噬细胞的来源,睾丸中何种细胞驱动了巨噬细胞浸润,M1型巨噬细胞通过何种方式促进间质细胞LDCD以及这些过程中的分子生物学机制。未来的研究可以进一步探索这些问题,为全面了解缺氧所致睾丸生精损伤过程提供实验依据。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] LI Z B, WANG S M, GONG C L, *et al*. Effects of environmental and pathological hypoxia on male fertility[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 725933. DOI: 10.3389/fcell.2021.725933.

[2] SUN H, GONG T T, JIANG Y T, *et al*. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: results from a global burden of disease study, 2017[J]. Aging, 2019, 11(23): 10952-10991. DOI: 10.18632/aging.102497.

[3] GAT Y, GORNISH M, NAVON U, *et al*. Right varicocele and hypoxia, crucial factors in male infertility: fluid mechanics analysis of the impaired testicular drainage system[J]. Reprod Biomed Online, 2006, 13(4): 510-515. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60638-4.

[4] GAT Y, ZUKERMAN Z, CHAKRABORTY J, *et al*. Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid mechanics analysis of the impaired testicular venous drainage system[J]. Hum Reprod, 2005, 20(9): 2614-2619. DOI: 10.1093/humrep/dei089.

[5] LORD T. Pathophysiological effects of hypoxia on testis function and spermatogenesis[J]. Nat Rev Urol, 2025, 22(7): 470-488. DOI: 10.1038/s41585-024-00969-6.

[6] YANG G, SHI R, ZHANG Q. Hypoxia and oxygen-sensing signaling in gene regulation and cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8162. DOI: 10.3390/ijms21218162.

[7] ZENG J T, GAO W W, TANG Y, *et al*. Hypoxia-sensitive cells trigger NK cell activation *via* the KLF4-ASH1L-ICAM-1 axis, contributing to impairment in the rat epididymis[J]. Cell Rep, 2023, 42(11): 113442. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113442.

[8] QIN H, ABULAITI A, MAIMAITI A, *et al*. Integrated machine learning survival framework develops a prognostic model based on inter-crosstalk definition of mitochondrial function and cell death patterns in a large multicenter cohort for lower-grade glioma[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 588. DOI: 10.1186/s12967-023-04468-x.

[9] MA Y, ZHOU Y, ZHU Y C, *et al*. Lipophagy contributes to testosterone biosynthesis in male rat leydig cells[J]. Endocrinology, 2018, 159(2): 1119-1129. DOI: 10.1210/en.2017-03020.

[10] CHO Y M, CHOU J C, FANG C M, *et al*. Chronic intermittent hypoxia stimulates testosterone production in rat Leydig cells[J]. Life Sci, 2019, 233: 116694. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116694.

[11] WANG X T, JIN L H, JIANG S, *et al*. Transcription regulation of NRF1 on StAR reduces testosterone synthesis in hypoxemic murine[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019, 191: 105370. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.04.019.

[12] BAI G, YANG B, TONG W M, *et al*. Hypobaric hypoxia causes impairment of spermatogenesis in developing rats at pre-puberty[J]. Andrologia, 2018. DOI: 10.1111/and.13000. DOI: 10.1111/and.13000.

[13] RAFF H, HOEYNCK B, JABLONSKI M, *et al*. Insulin sensitivity, leptin, adiponectin, resistin, and testosterone in adult male and female rats after maternal-neonatal separation and environmental stress[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2018, 314(1): R12-R21. DOI: 10.1152/ajpregu.00271.2017.

[14] KIM S D, CHO K S. Obstructive sleep apnea and testosterone deficiency[J]. World J Mens Health, 2019, 37(1): 12. DOI: 10.5534/wjmh.180017.

[15] WALKER W H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis[J]. Phil Trans R Soc B, 2010, 365

(1546): 1557-1569. DOI:10.1098/rstb.2009.0258.

[16] LEI T, YANG Y, YANG W X. Luteinizing hormone regulates testosterone production, leydig cell proliferation, differentiation, and circadian rhythm during spermatogenesis [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(8): 3548. DOI: 10.3390/ijms26083548.

[17] GOTO T, HIRABAYASHI M, WATANABE Y, *et al*. Testosterone supplementation rescues spermatogenesis and *in vitro* fertilizing ability of sperm in Kiss1 knockout mice [J]. Endocrinology, 2020, 161(9): bqaa092. DOI: 10.1210/endocr/bqaa092.

[18] MÍNGUEZ-ALARCÓN L, GASKINS A J, MEEKER J D, *et al*. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health[J]. Fertil Steril, 2023, 120(6): 1138-1149. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2023.10.008.

[19] MEINHARDT A, DEJUCQ-RAINSFORD N, BHUSHAN S. Testicular macrophages: development and function in health and disease[J]. Trends Immunol, 2022, 43(1): 51-62. DOI:10.1016/j.it.2021.11.003.

[20] MULTHOFF G, VAUPEL P. Hypoxia compromises anti-cancer immune responses[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1232: 131-143. DOI:10.1007/978-3-030-34461-0_18.

[21] ZOU Z J, LIN H F, LI M S, *et al*. Tumor—associated macrophage polarization in the inflammatory tumor microenvironment[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1103149. DOI:10.3389/fonc.2023.1103149.

[22] DU S Y, ZHANG X J, JIA Y X, *et al*. Hepatocyte HSPA12A inhibits macrophage chemotaxis and activation to attenuate liver ischemia/reperfusion injury *via* suppressing glycolysis-mediated HMGB1 lactylation and secretion of hepatocytes[J]. Theranostics, 2023, 13(11): 3856-3871. DOI:10.7150/thno.82607.

[23] AL-QAZAZI R, LIMA P D A, PRISCO S Z, *et al*. Macrophage-NLRP3 activation promotes right ventricle failure in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 206(5): 608-624. DOI: 10.1164/rccm.202110-2274OC.

[24] SEKINE H, TAKEDA H, TAKEDA N, *et al*. PNPO-PLP axis senses prolonged hypoxia in macrophages by regulating lysosomal activity[J]. Nat Metab. 2024, 6(6): 1108-1127. DOI: 10.1038/s42255-024-01053-4.

[25] HE S J, FAN C Y, JI Y M, *et al*. SENP3 facilitates M1 macrophage polarization *via* the HIF-1α/PKM2 axis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Innate Immun, 2023, 29 (1/2): 25-34. DOI: 10.1177/17534259231166212.

[26] ZHANG G, TAO X, JI B W, *et al*. Hypoxia-driven M2-polarized macrophages facilitate cancer aggressiveness and temozolomide resistance in glioblastoma[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 1614336. DOI: 10.1155/2022/1614336.

[27] GEMINGNUER A, YIN R, LIU Y, *et al*. Lysosome-dependent cell death: disease implications and potential therapeutic targets[J]. Mol Biol Rep, 2025, 52(1): 881. DOI:10.1007/s11033-025-10997-z.

[28] RAI R, DEY D K, BENBROOK D M, *et al*. Niclosamide causes lysosome-dependent cell death in endometrial cancer cells and tumors[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 161: 114422. DOI:10.1016/j.biopha.2023.114422.

[29] CUI L, ZHAO L P, YE J Y, *et al*. The lysosomal membrane protein Lamp2 alleviates lysosomal cell death by promoting autophagic flux in ischemic cardiomyocytes[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 31. DOI:10.3389/fcell.2020.00031.

[30] JEELANI I, MOON J S, DA CUNHA F F, *et al*. HIF-2α drives hepatic Kupffer cell death and proinflammatory recruited macrophage activation in nonalcoholic steatohepatitis [J]. Sci Transl Med, 2024, 16(764): eadi0284. DOI:10.1126/scitranslmed.adi0284.

[31] WANG B J, CHEN Y Y, CHANG H H, *et al*. Zinc oxide nanoparticles exacerbate skin epithelial cell damage by upregulating pro-inflammatory cytokines and exosome secretion in M1 macrophages following UVB irradiation-induced skin injury[J]. Part Fibre Toxicol, 2024, 21(1): 9. DOI:10.1186/s12989-024-00571-z.

[32] XIANG L Y, LOU J S, ZHAO J Y, *et al*. Underlying mechanism of lysosomal membrane permeabilization in CNS injury: a literature review[J]. Mol Neurobiol, 2025, 62(1): 626-642. DOI:10.1007/s12035-024-04290-6.

(收稿:2025-10-26;修回:2025-11-28)

(编辑 汤锦波)